

Original document

# Process for synthesis of cucurbitine (cucurbitin) using 1-benzyl-3-pyrrolidone as starting material

Patent number: FR2673626

Publication date: 1992-09-11

Inventor: VALERIE THIERY; GERALD GUILLAUMET; PATRICE ANDRE

Applicant: DIOR CHRISTIAN PARFUMS (FR)

Classification:

- international: (IPC1-7): C07D207/16

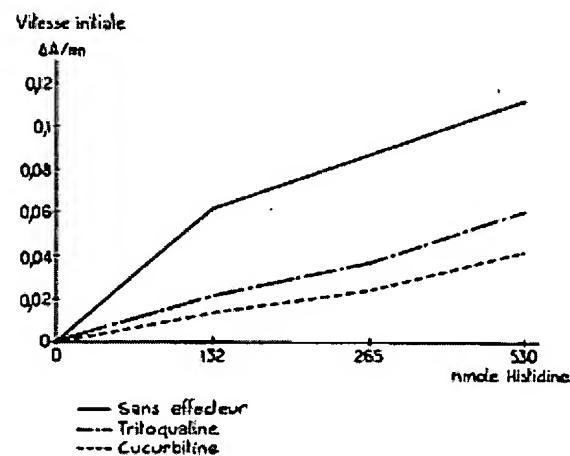
- european:

Application number: FR19910006889 19910606

Priority number(s): FR19910006889 19910606

[View INPADOC patent family](#)[Report a data error here](#)**Abstract of FR2673626**

The invention relates to a process for the synthesis of cucurbitine. This synthetic process is characterised in that 1-benzyl-3-pyrrolidone is used as starting material. Cucurbitine can then be used to prepare a cosmetic or pharmaceutical, especially dermatological, composition having an anti-allergic activity or in the preparation of a cosmetic or pharmaceutical composition with a reduced allergising risk.

Courbe de MichaelisData supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide**Description of FR2673626**

Procédé de synthèse de la cucurbitine utilisant comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 673 626

(21) N° d'enregistrement national : 91 06889

(51) Int Cl<sup>5</sup> : C 07 D 207/16

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 06.06.91.

(71) Demandeur(s) : PARFUMS CHRISTIAN DIOR  
Société anonyme — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 11.09.92 Bulletin 92/37.

(72) Inventeur(s) : Thiéry Valérie, Guillaumet Gérald et  
André Patrice.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(74) Mandataire : Cabinet Beau de Loménie.

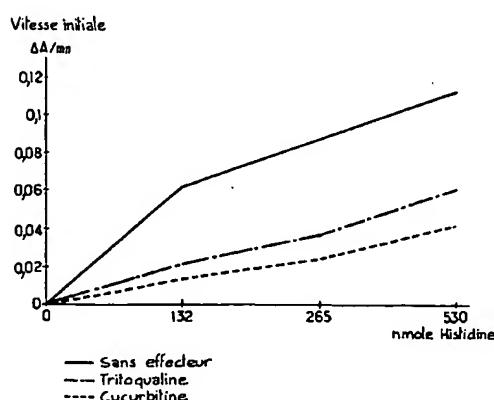
(54) Procédé de synthèse de la cucurbitine utilisant comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrroolidinone.

(57) L'invention concerne un procédé de synthèse de la cu-  
curbitine.

Ce procédé de synthèse est caractérisé en ce qu'on uti-  
lise comme produit de départ de la 1-benzyl-3-  
pyrroolidinone.

La cucurbitine peut ensuite être utilisée pour préparer  
une composition cosmétique ou pharmaceutique, notam-  
ment dermatologique, à activité anti-allergique, ou pour la  
préparation de composition cosmétique ou pharmaceuti-  
que à risque allergisant réduit.

Courbe de Mickaelis



FR 2 673 626 - A1

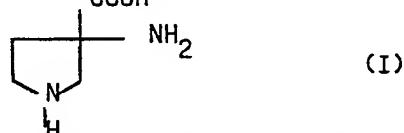


Procédé de synthèse de la cucurbitine utilisant comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

La présente invention concerne essentiellement un procédé de synthèse de la cucurbitine, à partir de la 1-benzyl-05 3-pyrrolidinone.

L'invention concerne aussi l'utilisation de la cucurbitine pour la préparation de composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, anti-allergique, et un procédé en comportant application.

10 La cucurbitine, ou acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique, de formule I, suivante :



15 est un acide aminé naturel soluble dans l'eau que l'on trouve dans les cucurbitacées (voir V.H. Mihranian et al., LLOYDIA (1968), 31 (1) 23-29).

La cucurbitine est connue comme anti-parasitaire, en particulier comme anthelmintique contre *Schistosoma japonicum*. (Morimoto Y. et al., Chem. Pharm. Bull. (1987) 35 (9) 3845-3849).

20 La cucurbitine peut être obtenue par voie d'extraction sous forme Lévogyre ou par voie de synthèse sous forme racémique. Parmi les diverses méthodes de synthèse de cucurbitine, on peut citer particulièrement la méthode de synthèse de H.J. Monteiro, J. Chem. Soc., Chem. Commun. (1973) 2. Cette méthode ne conduit qu'à 25 des rendements relativement faibles en cucurbine racémique. Une autre méthode de synthèse permet d'obtenir séparément l'un et l'autre isomère optique de la cucurbitine. Il s'agit de la méthode de Morimoto et al., Chem. Pharm. Bull. (1987) 35 (9) 3845-3849, qui est une méthode de synthèse par voie enzymatique stéréospécifique 30 par l'emploi d'une estérase de foie de porc. Cette méthode est cependant compliquée, et nécessite un nombre d'étapes relativement élevé.

IL a maintenant été découvert de manière inattendue que la cucurbitine inhibait la formation d'histamine, médiateur bien connu des allergies, et présentait donc une activité hypohistaminémiante précieuse. Cette activité hypohistaminémiante résulte de l'action inhibitrice de la cucurbitine sur l'histidine décarboxylase qui est l'enzyme responsable de la transformation de l'histidine en histamine. De ce fait, l'administration de la cucurbitine contribue à diminuer la concentration d'histamine dans le sérum sanguin et les tissus.

Ceci constitue un progrès technique important car les manifestations allergiques, notamment les allergies pulmonaires et cutanées, posent aujourd'hui de nombreux problèmes aux thérapeutes qui disposent d'un nombre limité de substances actives et en outre, certaines de ces substances peuvent présenter des effets secondaires. Ainsi, la mise au point d'une nouvelle composition préventive et curative des allergies constitue donc un besoin important.

Ainsi, la présente invention a pour objet principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant d'inhiber la formation d'histamine, agent médiateur dans le cadre des manifestations allergiques, afin de permettre la prévention et le traitement des manifestations allergiques.

Selon un autre aspect, la présente invention a pour objet principal de résoudre le problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de prévenir et de traiter les manifestations allergiques.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de diminuer le potentiel allergisant des compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques.

La présente invention a encore pour but de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une solution permettant de réaliser la synthèse de la cucurbitine par un procédé de synthèse simple, nécessitant un minimum d'étapes, en de bons rendements.

La présente invention permet de résoudre l'ensemble de ces problèmes techniques d'une manière simple, fiable et reproducible, utilisable à l'échelle industrielle.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention 05 concerne l'utilisation de la cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters, ou d'un extrait de plante en contenant, pour la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, à activité antiallergique.

Selon une variante de réalisation particulière, il s'agit 10 de la préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, destinée à la prévention ou au traitement symptomatique des manifestations allergiques, quelle qu'en soit l'origine et le point d'application, notamment les bronches, la peau et l'oeil. Ainsi, ladite composition est destinée notamment à 15 la prévention ou au traitement symptomatique de l'asthme bronchique allergique ou de l'effort, du rhume des foins, des rhinites et trachéites spasmodiques, de l'urticaire autres éruptions allergiques, de l'eczéma, rougeurs ou irritations cutanées d'origine allergique, des prurits, de l'oedème de Quincke, des 20 conjonctivites allergiques, ainsi que des réactions allergiques d'origine médicamenteuse.

Dans le domaine plus particulier de la cosmétologie, ladite composition est destinée avantageusement aux lignes de produits hypoallergéniques ou pour peaux sensibles ou irritables.

25 La cucurbitine peut être utilisée soit sous forme libre, soit sous forme de l'un de ses sels ou de ses esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement, notamment dermatologiquement, acceptables. Les sels et esters précités peuvent être préparés par des procédés classiques bien connus de l'homme de l'art. Parmi les sels, citons le mono- et dibromohydrate et le mono- et dichlorhydrate. Parmi les 30 esters, citons l'ester méthylique et l'ester éthylique.

35 Suivant une variante avantageuse, l'extrait de plante précité contenant de la cucurbitine est un extrait de cucurbitacée, en particulier de *Cucurbita maxima* Duch., de *Cucurbita pepo* L. ou de *Cucurbita moschata* Duch ; de préférence, il s'agit d'un extrait de pépin ou de pulpe de fruit.

05 Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne aussi une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, comme ingrédient actif, de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement acceptable ou un extrait de plante en contenant.

Suivant une variante avantageuse, l'extrait de plante précité est un extrait de cucurbitacée tel que précédemment défini.

10 Selon une variante de réalisation préférée, la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters est présente en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, en particulier à une concentration de 0,001% à 10 % de préférence de 0,01% à 5% en poids de la composition totale.

15 Selon un troisième aspect, la présente invention concerne une composition pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisée en ce qu'elle contient de la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables en une quantité efficace pour présenter une activité antiallergique, en particulier pour prévenir ou traiter les manifestations allergiques.

20 Suivant une variante, les compositions cosmétiques et pharmaceutiques précitées contiennent un extrait d'origine végétale tel que précédemment défini.

25 Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne encore un procédé pour diminuer le potentiel allergisant d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'on incorpore à ladite composition une quantité efficace de cucurbitine sous forme libre ou sous forme de l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini, de sorte que la composition finale présente un risque allergisant réduit.

30 Dans le cadre de l'un quelconque des aspects précédents, la concentration pondérale préférée en cucurbitine, ou en ses sels ou esters pour les compositions à usage topique, est comprise entre 0,001 % et 10 %, de préférence encore entre 0,01 % et 5 %.

35 Pour les compositions destinées à l'administration par

voie générale (telle que voie orale, parentérale, rectale, inhalations,...) la concentration en cucurbitine n'est pas critique et peut atteindre par exemple 60 % de la compositon. La posologie chez l'homme sera généralement comprise entre 0,1 mg/kg/jour et 05 20 mg/kg/jour et de préférence entre 1 mg/kg/jour et 15 mg/kg/jour.

Par ailleurs, on utilise généralement la cucurbitine naturelle, de forme lévogyre, ou ses sels ou esters. Des sources de cucurbitine lévogyre particulièrement intéressantes sont la pulpe et les pépins des cucurbitacées, en particulier des espèces 10 *Cucurbita pepo L.*, *Cucurbita maxima Duch.*, *Cucurbita moschata Duch.* Cependant, on peut également utiliser la forme racémique de la cucurbitine ou de ses sels ou esters.

Par ailleurs, la cucurbitine peut être utilisée sous forme pure, ou sous forme d'extraits, selon l'une quelconque des 15 procédures d'extraction connues à l'homme de l'art. Des procédures d'extraction particulièrement intéressantes sont décrites dans la publication de Valentine H. MIHRANIAN et al. dans *Lloydia* 1968, 31, (1) 23-29 qui est incorporée ici par référence, en particulier page 24. Une source préférée d'obtention de cucurbitine est 20 constituée par la pulpe et surtout les pépins de l'espèce *Cucurbita*, telles que *Cucurbita pepo L.*, *Cucurbita maxima Duch.* et *Cucurbita moschata Duch.*

Selon un cinquième aspect, la présente invention couvre également un procédé de traitement de l'être humain ou d'un animal, 25 caractérisé en ce qu'on administre audit être humain ou audit animal une quantité efficace de cucurbitine ou de l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini, pour prévenir ou traiter les manifestations allergiques.

30 En particulier, le traitement précité s'applique à la prévention ou au traitement symptomatique de l'asthme bronchique allergique ou de l'effort, du rhume des foins, des rhinites et trachéites spasmodiques, de l'urticaire et autres éruptions allergiques, de l'eczéma, rougeurs ou irritations cutanées d'origine

allergique, des prurits, de l'oedème de Quincke, des conjonctivites allergiques, ainsi que des réactions allergiques d'origine médicamenteuse.

05 Selon une variante de réalisation, on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables par voie topique à une concentration comprise de préférence entre 0,01% et 10% en poids.

10 Selon une autre variante de réalisation, on administre la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters pharmaceutiquement acceptables par voie générale à une posologie chez l'homme comprise entre 0,1 mg/kg/jour et 20 mg/kg/jour et de préférence entre 1 mg/kg/jour et 15 mg/kg/jour.

15 L'invention concerne encore un procédé de préparation d'une composition cosmétique ou pharmaceutique, notamment dermatologique, caractérisé en ce qu'on incorpore la cucurbitine ou l'un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables, ou d'un extrait végétal en contenant tel que précédemment défini, dans un support, véhicule ou excipient cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

20 Selon une variante de réalisation, la cucurbitine ou un de ses sels ou esters cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables est incorporé dans une formulation cosmétique ou pharmaceutique complète pour diminuer le risque allergisant de celle-ci.

25 Selon une autre variante de réalisation, on prépare une composition à activité antiallergique. Des variantes de préparation résultent également de la description précédente.

30 Suivant un mode particulier de réalisation de l'invention dans le cadre de l'un des aspects exposés plus haut, la composition précitée contenant la cucurbitine ou un de ses sels ou esters ou l'extrait de plante précité contient en outre des vésicules de type liposome. Selon une variante particulière, la cucurbitine, son sel ou ester, est encapsulé, au moins en partie, dans les vésicules de type liposome. Par l'expression "vésicule de type liposome", on entend aussi bien des phases lamellaires lipidiques

hydratées que des vésicules lipidiques formées de lipides amphiphiles ioniques ou non-ioniques. Egalement, par l'expression "incorporer au moins en partie dans des vésicules de type liposome", on entend dans la présente description et les revendications que la cucurbitine, son sel ou ester est combiné à des vésicules de type liposome quelle que soit la forme de cette combinaison. Cependant, une combinaison préférée réside dans l'encapsulation de la cucurbitine, son sel ou ester dans des vésicules de type liposome. Mais il n'est pas nécessaire que la totalité soit incorporée ou encapsulée pour obtenir l'effet anti-allergique recherché selon l'invention.

On sait que les vésicules de type "liposome" sont préparées à partir de substances lipidiques. Le terme "lipidique" couvre toutes les substances comprenant une chaîne carbonée dite grasse, comportant généralement plus de 5 atomes de carbone, cette substance étant habituellement dénommée "lipide".

Selon l'invention, on utilise à titre de lipide, pour former soit les phases lamellaires lipidiques, soit les vésicules de type liposome, des lipides amphiphiles, c'est-à-dire constitués de molécules possédant un groupe hydrophile indifféremment ionique ou non ionique et un groupe lipophile, ces lipides amphiphiles étant susceptibles de former des phases lamellaires lipidiques ou des vésicules de type liposome en présence d'une phase aqueuse.

En particulier, parmi ces lipides, on peut citer : les phospholipides, les phosphoaminolipides, les glycolipides, les alcools gras polyoxyéthylénés, les esters de polyol éventuellement polyoxyéthylénés. De telles substances sont par exemple constituées par une lécitine d'oeuf ou de soja éventuellement hydrogénées, une phosphatidylcholine, une phosphatidylsérine, une sphingomyéline, un cérébroside ou un stéarate de polyglycérol oxyéthyléné.

L'incorporation dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des liposomes des composés utilisés conformément à la présente invention peut être réalisée selon des techniques de préparation connues, décrites par exemple dans le document US-A-4 508 703 et éventuellement en combinaison avec le document US-A-4 621 023.

Selon un septième aspect, la présente invention couvre encore un procédé de synthèse de la cucurbitine, caractérisé en ce qu'on utilise comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

05 Selon une variante de réalisation particulière de ce procédé de synthèse, on traite la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec une solution ammoniacale de chlorure d'ammonium et de cyanure de potassium, pour obtenir la  $(+)$ 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine. On transforme ensuite ce composé par hydrolyse acide ou basique en 10 acide  $(+)$ 3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique, et enfin on procède à une hydrogénolyse catalytique pour obtenir l'acide  $(+)$ 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou  $(+)$ cucurbitine.

15 Suivant une variante préférée, la solution ammoniacale précitée est une solution hydroalcoolique, l'alcool étant avantageusement de l'isopropanol ou du méthanol.

20 Suivant une autre variante préférée, l'hydrolyse précitée est effectuée au moyen d'une solution aqueuse 6 N d'acide bromhydrique.

25 Selon encore une autre variante, l'hydrogénolyse catalytique est effectuée dans l'eau sous hydrogène à pression atmosphérique en présence d'un catalyseur tel que du palladium sur charbon dispersé dans le milieu réactionnel aqueux.

30 Selon un mode de réalisation préféré du procédé de synthèse, on laisse réagir la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec le chlorure d'ammonium et le cyanure de potassium dans un rapport molaire 1/4/4 à la température ambiante pendant au moins 48 h.

35 Selon une autre variante de réalisation particulière, on sépare les isomères optiques du mélange racémique, selon toute technique de séparation connue de l'homme de l'art, et en particulier par l'intermédiaire de la préparation de diastéréoisomères.

Le procédé de synthèse de la cucurbitine selon l'invention conduit à des rendements particulièrement élevés en cucurbitine racémique, en moyenne 2 à 3 fois plus élevés que ceux des procédés connus.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre faite en référence à divers exemples de préparation de cucurbitine, ainsi qu'à divers exemples rapportant les résultats d'essais pharmacologiques, ainsi que divers exemples de formulation cosmétique ou pharmaceutique. Dans les exemples, les pourcentages sont donnés en poids, sauf indication contraire.

10

Exemple 1Synthèse de la cucurbitine sous forme de mélange racémique

On procède de la manière suivante :

a) Synthèse de la (+)-3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine

0,5 g de 1-benzyl-3-pyrrolidinone (2,85 mmol) dissous dans 3 ml de propanol-2 sont ajoutés à une solution de 0,741 g (11,4 mmol) de cyanure de potassium et de 0,615 g (11,4 mmol) de chlorure d'ammonium dans 7 ml d'ammoniaque à 28 %. Le mélange reste à température ambiante sous agitation pendant 3 jours. La solution est lavée avec 15 ml d'une solution de carbonate de potassium à 10 %, et extraite au dichlorométhane (3 xc 15 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation des solvants, on obtient une huile (0,475 g).

On purifie sur colonne de silice avec dépôt solide. On élue avec un mélange éther-éther de pétrole 4 : 2.

On obtient 0,402 g d'un solide beige (rendement : 70%) constitué par la 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine ayant le spectre RMN suivant :

RMN<sup>1</sup>H, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>

1,8 (s large, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 1,97 (ddd, 1H, J<sub>4,4'</sub> = 13,4, J<sub>4,5'</sub> = 8, J<sub>4,5'</sub> = 5,4) ; 2,5 (ddd, 1H, J<sub>4,4'</sub> = 8, J<sub>4,5'</sub> = 8, J<sub>4',5'</sub> = 5,4) ; 2,64 (d, 1H, J<sub>2,2'</sub> = 9,4) ; 3,04 (d, 1H, J<sub>2',2</sub> = 9,4) ; 3,67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) ; 7,33 (m, 5H, protons aromatiques).

b) Synthèse de l'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)1-benzyl-cucurbitine

On peut réaliser l'hydrolyse du composé précédemment obtenu soit en milieu acide, soit en milieu basique.

05 Hydrolyse en milieu acide :

0,3 g (1,49 mmol) de 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine, obtenue à l'étape a) dissous dans 5 ml d'acide bromhydrique à 48 %, sont portés à 40-50°C pendant 4 h. Après évaporation de 10 l'acide, on purifie sur colonne de silice. Les impuretés sont éliminées par  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10 % et l'aminoacide est sorti par  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  15 %.

Après élimination du méthanol, on décolore le composé au noir animal dans un minimum aqueux à chaud puis on lyophilise.

15 On obtient un solide jaune foncé (rendement : 80%) constitué par l'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique sous forme mono- ou dibromhydrate ayant le spectre RMN suivant :

RMN<sup>1</sup>H, 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$

20 2,47-2,69 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ) ; 2,75-2,91 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,69-3,94 (m, 3H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{5'}$ ,  $\text{H}_2$ ) ; 4,12 (d,  $J_{2,2} = 14,2$ , 1H,  $\text{H}_{2'}$ ) ; 4,58 (2d,  $J = 13,8$ , 2H,  $\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ ) ; 7,62 (s, 5H, protons aromatiques).

Hydrolyse en milieu basique :

25 On dissout 280 mg (1,39 mmol) de 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine de l'étape a) dans 2 ml d'éthanol. On ajoute 5 ml d'une solution de soude à 10 % puis on porte à reflux pendant 5 h. Après refroidissement, on acidifie avec de l'acide bromhydrique à 48 %.

30 On purifie sur colonne de silice :  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  10 %. On décolore au noir animal puis on lyophilise. La présence des sels de bromure de sodium entraîne l'obtention d'un rendement supérieur à 100 %.

35 Pour éliminer les sels présents, on préleve 200 mg de pyrrolidine que l'on porte à pH = 8 avec une solution de soude à

10 %. On charge la Duolite  $\text{Cl}^-$  avec une solution d'acide bromhydrique 2N. On élimine les sels avec de l'eau distillée. Pour décrocher la pyrrolidine, on utilise une solution d'acide bromhydrique 0,1 N.

05 Après lyophilisation, on obtient 120 mg d'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique (rendement : 40%).

c) Synthèse de l'acide (+)3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)cucurbitine

10 300 mg de bromhydrate d'acide (+)3-amino-1-benzyl-3-pyrrolidinecarboxylique obtenu à l'étape b) sont dissous dans 10 ml d'eau. On disperse 0,5 mg de charbon à 10 % de palladium, puis on place cette suspension en atmosphère d'hydrogène sous pression atmosphérique. L'agitation est maintenue pendant 18 h. Après 15 filtration sur papier-filtre et lyophilisation, on obtient un solide jaune (98 %) constitué par l'acide (+)3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique ou (+)cucurbitine ayant le spectre RMN suivant :

RMN  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$

2,45 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ) ; 2,69 (m, 1H,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,61 (d, 1H,  $\text{J}_{2,2'} = 13,4$ ) ;  
20 3,67-3,78 (m, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 4 (d, 1H,  $\text{J}_{2',2} = 13,4$ ).

#### Exemple 2

##### Optimisation du rendement de la synthèse de la (+)cucurbitine

25 On opère comme indiqué comme à l'exemple 1, en choisissant à l'étape b) l'hydrolyse par l'acide bromhydrique 6 N, en faisant toutefois varier la proportion des réactifs de l'étape a).

Les rendements obtenus figurent au tableau I ci-après.

TABLEAU I

05	Nombre équivalents			Conditions expérimentales de l'étape a)	Rendement		
	moles				CN	COOH	
	N.B.P	NH <sub>4</sub> Cl	KCN				
10	1	1-1	1	6 h température ambiante	*	< 10 %	
	1	1-1	1	4 h 40°-50°	*	< 10 %	
	1	4	4	4 h 40°-50°	*	20 %	
	1	8	8	4 h 40°-50°	*	20 %	
	1	4	4	48 h température ambiante	66 %	44 %	
	1	4	4	72 h température ambiante	70 %	49 %	
	1	4	4	84 h température ambiante	70 %	56 %	

15

N.B.P. : 1-benzyl-3-pyrrolidinone

\* : amino-nitrile non isolé

CN : rendement en 3-amino-1-benzyl-3-cyano-pyrrolidine

20

COOH : rendement global en acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique

La dernière colonne du tableau I contient les rendements en (+)cucurbitine par rapport aux réactifs de départ.

25

On observe que les rendements sont maximums si la réaction est menée à température ambiante pendant une durée supérieure à 48 h en utilisant des proportions 1/4/4 entre les réactifs : 1-benzyl-3-pyrrolidone, chlorure d'ammonium et cyanure de potassium.

30

On a par ailleurs observé que l'hydrolyse au moyen de l'acide bromhydrique conduisait également à de meilleurs rendements que lorsque l'on utilise de l'acide chlorhydrique, à la même concentration, comme agent d'hydrolyse.

Exemple 3Séparation des isomères optiques de la cucurbitine

La méthode de séparation, connue en elle-même, est basée sur la préparation de dérivés diastéroisomères par couplage de la 05 (+)cucurbitine avec certains réactifs optiquement actifs, après protection de la fonction acide par estérification et de la fonction amine cyclique. Chaque forme de ces stéréoisomères, correspondant à l'un ou l'autre isomère de la cucurbitine, sera isolée par chromatographie, notamment par chromatographie liquide à haute 10 performance ou sur colonne de silice. Pour régénérer ensuite les deux énantiomères de la cucurbitine, il suffit de saponifier l'ester de protection puis d'hydrolyser pour libérer la fonction acide, et de libérer la fonction amine, par exemple par hydrogénolyse comme décrit à l'exemple 1 dans le cas où la fonction amine 15 était protégée par substitution avec un radical benzyle.

Comme réactifs pour la présente méthode, on peut utiliser des composés optiquement actifs Lévogyres S, tels que :

- le chlorure de camphanyle-1S,
- l'acide (S)--(-)- $\alpha$ -méthoxy- $\alpha$ -trifluorométhyl-phényl-20 acétique,
- la N-(tertio-butoxycarbonyl)-L-phénylalanine.

Le présent exemple décrit la résolution du racémique de la cucurbitine au moyen du couplage avec le chlorure de camphanyle-1S.

25

a) Protection de la fonction acide de la (+)1-benzyl-cucurbitine :  
synthèse de son ester méthylique

0,1 g de (+)1-benzyl-cucurbitine (0,20 mmol), obtenu à l'étape b de l'exemple 1, est ajouté lentement à une solution 30 glacée de chlorure de thionyle (0,28 mmol) et de méthanol (2 mL). La température de la réaction ne doit pas s'élever au-dessus de -5°C. Le mélange est mis sous agitation à 0°C pendant 2 h, puis ramené à température ambiante pendant deux jours.

Après évaporation, on purifie sur colonne de silice avec 35 dépôt solide. (Eluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  de 10 à 50 %).

On obtient un produit jaune avec un rendement à 70 %, constitué par l'ester méthylique de la (+)1-benzyl-cucurbitine.

b) Couplage avec le chlorure de camphanyle-1S (-)

05 On neutralise 1 mol d'ester méthylique de la (+)1-benzyl-cucurbitine en solution dans 1,5 ml de chlorure de méthylène avec 1 mole de triéthylamine. On ajoute 1,1 équivalent de 1S (-) chlorure de camphanyle. On laisse sous agitation à température ambiante pendant 16 h.

10 On purifie sur colonne de silice avec dépôt solide (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10 %).

La séparation des diastéréoisomères a été effectuée par H.P.L.C. sur diverses colonnes notamment des Zorbax<sup>®</sup>  $\text{NH}_2$  greffées.

15 Exemple 4

Préparation d'un extrait de pulpe de Cucurbita pepo

On coupe en deux des fruits frais de Cucurbita pepo, on enlève les pépins qui peuvent servir à la fabrication des extraits de pépins. On broie la pulpe ainsi obtenue que l'on lyophilise. On 20 récupère la poudre que l'on dégraisse à l'éther de pétrole à raison de 1 L pour 100 g de poudre. On récupère l'insoluble par filtration qui constitue l'extrait de pulpe de Cucurbita pepo recherché. On dose la proportion de cucurbitine dans cet extrait par H.P.L.C. et l'on obtient une concentration de 0,03% en poids de cucurbitine 25 dans l'extrait sec dégraissé.

Exemple 5

Préparation d'un extrait de graines de Cucurbita pepo

On broie 1,5 kg de graines préalablement décortiquées de 30 Cucurbita pepo. La poudre obtenue est soumises trois fois à une extraction à l'hexane (3 litres, 2 litres et 1,8 litre), pour éliminer les matières grasses. Le gâteau séché obtenu est extrait par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique maintenue à environ pH 4. Cette extraction est faite en trois fois : deux à température ambiante - environ 22°C -, et la troisième à 70°C. A chaque fois, 35

le maintien en contact du gâteau-solution avec la solution chlorhydrique (2 litres la première fois et 2,5 litres les deux fois suivantes) est de 24 h.

Après essorage, on élimine le résidu solide et on 05 recueille la phase aqueuse que l'on évapore partiellement et que l'on centrifuge. Les culots de centrifugation sont lavés à l'eau distillée, puis éliminés. Les eaux de lavage sont réunies aux concentrats de centrifugation.

La fraction aqueuse est reconcentrée, puis traitée poids 10 pour poids avec de l'éthanol. Il se forme un précipité blanc que l'on élimine par centrifugation. Le surnageant hydro-alcoolique, que l'on neutralise par exemple avec de la soude, constitue un extrait contenant de la (-)-cucurbitine, que l'on peut utiliser en l'état.

15 On peut aussi évaporer l'alcool, puis atomiser la solution aqueuse obtenue, de manière à obtenir une poudre titrant 3 à 5 % en (-)-cucurbitine, selon les lots de graines utilisés.

#### Exemple 6

20 Mise en évidence de l'activité inhibitrice de la formation d'histamine par la cucurbitine

##### 1 - A par un test enzymatique

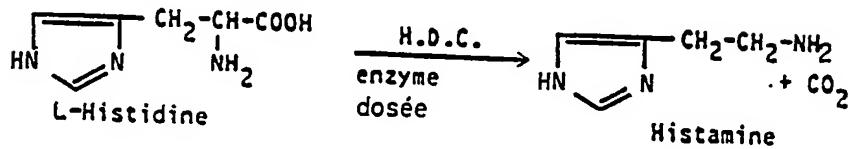
Ce test est basé sur l'action inhibitrice de la cucurbitine sur l'enzyme histidine décarboxylase (HDC) qui transforme 25 l'histidine en histamine, par rapport à celle de la tritoqualine, qui est un inhibiteur connu de l'HDC (voir Carpi C., Maggi G.C. Bull. Soc. Ital. Sper. 1968, 44 (6 543-4), et qui est utilisée en thérapeutique comme hypohistaminémiant sous le nom de Hypostamine<sup>®</sup>.

L'activité inhibitrice sur l'HDC peut être aisément réalisée par un dosage colorimétrique sur la base de la réaction chimique suivante :

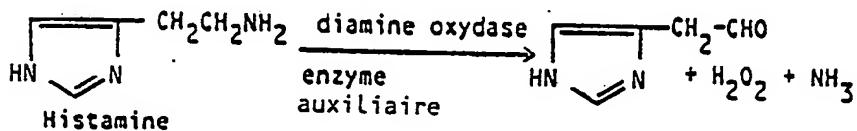
05

Dosage colorimétrique

10



15



20

MBTH = 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone

DMAB = 3-(diméthylamino)benzoic acid

25

En pratique, on observe que la coloration bleue est proportionnelle à la concentration en histidine consommée. On a ainsi pu définir des vitesses initiales de réaction et établir des courbes dites de Mickaelis comme décrit dans *Fundamentals of Enzymology*, 2nd Ed. Oxford Univ. Press, 1989.

La vitesse initiale est exprimée en variation d'absorbance par minute.

30

Les résultats obtenus avec diverses concentrations initiales d'histidine, à savoir à 132 nmol, 265 nmol, et 530 nmol, respectivement sans effecteur, avec tritoqualine comme inhibiteur d'HDC connu, et avec la cucurbitine sous forme racémique comme inhibiteur selon l'invention sont répertoriés au tableau II ci-après et font l'objet de la courbe de Mickaelis, objet de la figure 1.

Tableau II

	Histidine	132 nmol	265 nmol	530 nmol
05	Sans effecteur	0,062	0,089	0,1132
	Tritoqualine (art antérieur)	0,021	0,0374	0,0604
10	Cucurbitine (invention)	0,013	0,0242	0,042

15 IL ressort clairement du tableau II et de la courbe de Mickaelis objet de la figure 1, que la cucurbitine est un inhibiteur d'HDC beaucoup plus puissant que la tritoqualine, ce qui constitue un résultat tout à fait surprenant pour un homme de l'art.

20 1 - B par un dosage RIA

On peut également mettre en évidence l'activité anti-histaminique de la cucurbitine par un dosage radioimmunologique (Radio Immuno Assay ou "RIA") de la manière suivante.

25 Ce dosage a lieu en dosant l'histamine directement produite sous l'action de l'enzyme HDC, par la méthode RIA, bien connue à l'homme de l'art, et notamment décrite dans la notice d'utilisation d'un kit de dosage dénommé HISTAMINE Radioimmunoassay kit (Cat. # 1302) commercialisé par la Société IMMUNOTECH (Marseille-France).

30 On dose au cours du temps la quantité d'histamine libérée (en nanomoles) pour une concentration de  $16 \cdot 10^{-3}$  molaire d'histidine dans un tampon phosphate à pH 6,3, respectivement sans effecteur, avec la tritoqualine comme effecteur de comparaison et avec de la cucurbitine racémique de synthèse comme agent anti-histaminique selon l'invention. La tritoqualine et la cucurbitine sont utilisées à la concentration de  $2 \cdot 10^{-3}$  molaire.

Les résultats obtenus exprimés en nanomoles d'histidine libérée sont répertoriés au tableau III ci-après et font l'objet de la courbe de la figure 2 où l'on a indiqué en ordonnées le nombre de nanomoles d'histamine libérée et en abscisses le temps exprimé en minute. La courbe sans effecteur est tracée en trait continu, la courbe obtenue avec la tritoqualine est tracée en trait mixte et la courbe obtenue avec la cucurbitine est tracée en pointillés.

TABLEAU III

10

15

Temps	5 min **	10 min **	% I * (à 5 min)	% I * (à 10 min)
Sans effecteur	32,66	140,79	0	0
Tritoqualine	16,48	49,27	49	65
Cucurbitine	14,85	38,29	55	73

20

\* I = Inhibition

\*\* = nanomoles d'histamine libérée

25

On voit clairement à partir du tableau III que la quantité d'histamine libérée est nettement la plus faible en présence de cucurbitine.

30

Les résultats obtenus par la méthode RIA confirment donc que la cucurbitine a une activité inhibitrice de la formation d'histamine nettement plus puissante que la tritoqualine au bout de quelques minutes.

Divers exemples de formulation de compositions cosmétiques ou pharmaceutiques, notamment dermatologiques selon l'invention sont les suivants :

Exemple 7Comprimés

Par comprimé pour administration orale :

05	- (+) cucurbitine	100 mg
	- amidon	38 mg
	- lactose	75 mg
	- talc	10 mg
	- autres excipients pour comprimés (dont stéarate de magnésium) qsp	250 mg

10

Indications : traitement préventif et curatif des manifestations allergiques, notamment cutanées et respiratoires.

Posologie : 1 à 10 comprimés par jour chez l'adulte.

Diminuer les doses par 2 chez l'enfant jusqu'à 15 ans.

15

Exemple 8Poudre pour aérosol

Pour 100 g dans un flacon pressurisé :

20	- (+)cucurbitine	3 g
	- mannitol	1 g
	- gaz pulseurs	96 g

25 Indications : traitement préventif et curatif de toutes manifestations allergiques respiratoires telles que asthme bronchique et bronchites asthmatiformes.

Posologie : administration intrabronchique, à raison de 4

à 6 aspirations par jour en moyenne.

Exemple 9Emulsion adoucissante pour peaux sensibles

05                   - extrait de pépins selon l'exemple 5  
                      titrant 0,5 % en (-) cucurbitine           10 g  
                  - émulsion cosmétique  
                      classique pour peaux sensibles  
                      (alcools gras, alcools gras polyoxy-  
                      éthylénés huile minérale, palmitate  
                      d'isopropyle, glycérine, gélifiant,  
                      conservateurs, parfums, eau) qsp           100 g

10

Exemple 10Fond de teint hypoallergénique

15                   - extrait de pulpe de cucurbita  
                      pepo de l'exemple 4                   10 g  
                  - composition classique pour fond  
                      de teint (esters gras, squalane,  
                      lécithine de soja, silicone volatile,  
                      propylène glycol, gomme xanthane,  
                      filtre solaire, pigments, conserva-  
                      teurs, parfum, eau) qsp                   100 g

20

Exemple 11Mascara anti-irritant

25

- (+)-cucurbitine                   1,0 g  
                  - bleu outre-mer                   9,0 g  
                  - alcool hexadécylique           7,4 g  
                  - propylèneglycol                   9,0 g  
                  - acide stéarique                   11,3 g  
                  - monostéarate de glycérol       4,4 g  
                  - triéthylamine                   3,6 g  
                  - conservateur                   0,3 g  
                  - eau qsp...                   100 g

30

35

REVENDICATIONS

1. Procédé de synthèse de la cucurbitine, caractérisé en ce qu'on utilise comme produit de départ de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on traite la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec une solution ammoniaque de chlorure d'ammonium et de cyanure de potassium, en obtenant la (+) 1-benzyl-3-amino, 3-cyano-pyrrolidine que l'on transforme ensuite en acide (+) 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique par hydrolyse acide ou basique suivie d'une hydrogénolyse catalytique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on réalise la réaction de la 1-benzyl-3-pyrrolidinone avec le chlorure d'ammonium et le cyanure de potassium dans un rapport molaire 1/4/4 à la température ambiante pendant au moins 48 h.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on isole l'isomère lévogyre de l'acide 3-amino-3-pyrrolidinecarboxylique à partir du mélange racémique, en particulier par l'intermédiaire de la préparation des diastéréoisomères.

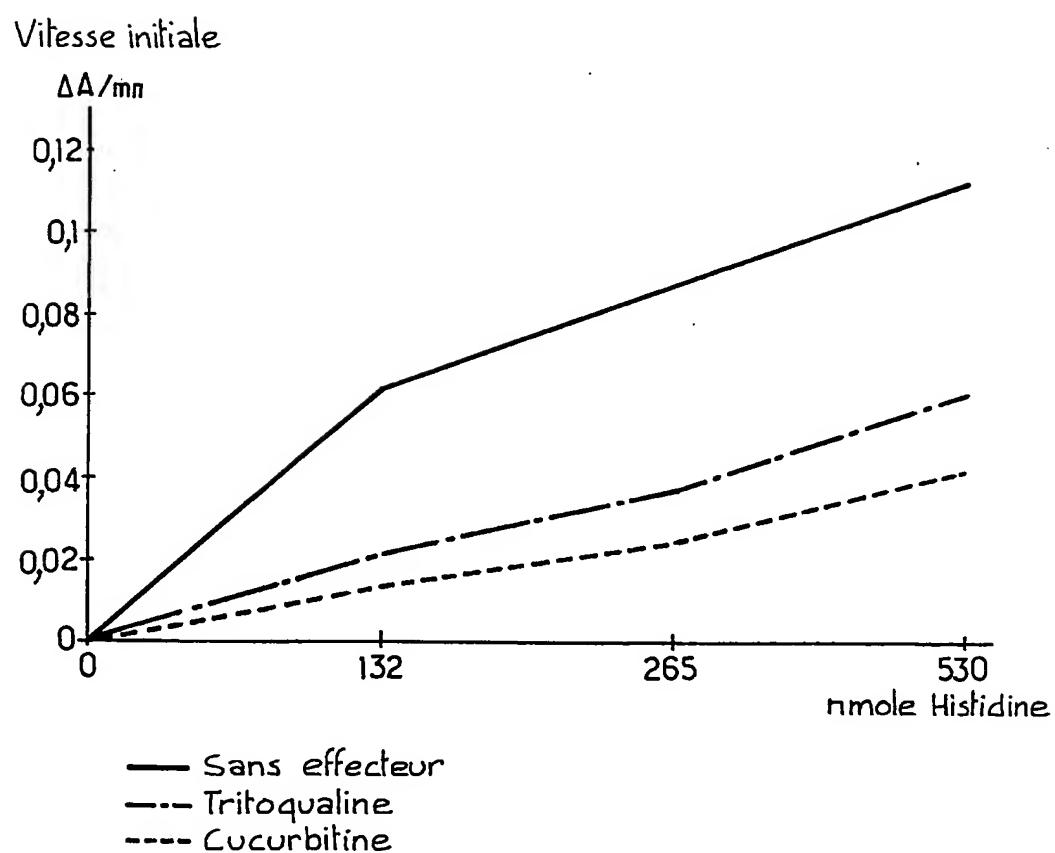
25

30

35

# FIG.1

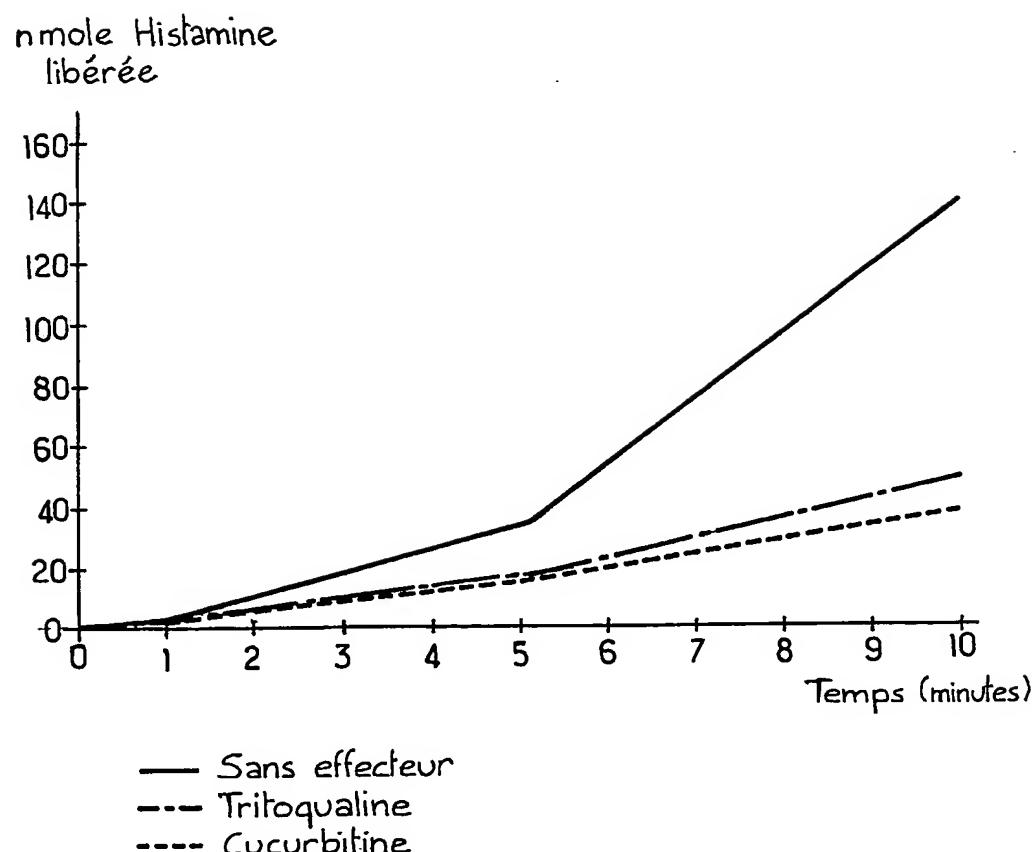
## Courbe de Mickaelis



2 / 2

## FIG. 2

### Dosage RIA



INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

## RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9106889  
FA 461371

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	SCIENTIA SINICA vol. X, 1961, pages 852 - 859; T. SUN ET. AL.: 'CHEMICAL STUDIES ON CUCURBITA MOSCHATA DUCH.' *En entier * ---	1-4
A	JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS. 1973, LETCHWORTH GB page 2; H. J. MONTEIRO: 'New Synthesis of the amino acid (+)-Cucurbitine' * En entier * ---	1-4
A	CHEMICAL AND PHARMACEUTICAL BULLETIN. vol. 35, no. 9, Septembre 1987, TOKYO JP pages 3845 - 3849; Y. MORIMOTO, K. ACHIWA: 'Enzymes and Catalysts.II.' * En entier * ---	1-4
A	'HOUBEN-WEYL: Methoden der Organischen Chemie, Band E5, 1985, Seite 534-543, herausgegeben von J. Falbe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, DE;' * En entier * ---	1-4
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C07D
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
27 MARS 1992		KISSLER B.E.
2 (Nombre de pages)		
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant

BEST AVAILABLE COPY